

UTILIZAÇÃO DE APARAS DE MADEIRA NO ENVELHECIMENTO DE VINHOS TINTOS: QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICAS DE MADEIRAS POR HPLC

Raquel GARCIA¹; Margarida VIEIRA²; Maria João CABRITA^{1,3}

RESUMO

O uso de aparas de madeira para fins enológicos tem vindo a ser explorado pois surge como uma alternativa menos dispendiosa, comparativamente ao uso de barricas, para além de promover o envelhecimento de forma mais célere. Dado que a aplicação de aparas de madeira para o envelhecimento de vinhos elimina a problemática associada ao uso de madeira própria para tanoaria torna-se pertinente o estudo da aplicabilidade de outras espécies de madeira, para além do carvalho, no estágio de vinhos. Assim, este trabalho visa o estudo da composição fenólica de madeiras de castanheiro e carvalho (nacional, francês e americano) para a sua aplicação sob a forma de aparas ou dominós para fins enológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos fenólicos, aparas de madeira, PLE (pressurized liquid extraction), HPLC-DAD

1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento do vinho é vulgarmente utilizado em enologia conduzindo a um incremento na qualidade do produto final. A madeira utilizada durante este processo apresenta capacidade para introduzir modificações físico-químicas e sensoriais no vinho, resultantes da extracção e degradação de diversos compostos da madeira, contribuindo para o aumento da complexidade organoléptica dos vinhos (PÉREZ-MAGARIÑO *et al.*, 2009). Estas propriedades encontram-se intimamente relacionadas com as características específicas da madeira, nomeadamente a espécie botânica, a origem geográfica, a variabilidade da composição anatómica, a composição química, assim como, os tratamentos tecnológicos realizados na indústria de tanoaria (CÉRDAN *et al.*, (2006)). Os compostos fenólicos representam um dos grupos de substâncias químicas que se encontram presentes em vinhos que estagiaram em madeira, influenciando significativamente diversas características do vinho, tais como a cor, o aroma e a adstringência (CABRITA *et al.*, 2008).

No entanto, o uso de barricas de madeira no envelhecimento de vinhos é um processo dispendioso, pelo que, se tornou frequente o recurso a tecnologias alternativas de utilização de madeiras, nomeadamente o uso de fragmentos de madeira de carvalho. Assim, este

¹ Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Email: raquelg@uevora.pt

² Aluna do mestrado de Viticultura e Enologia da Universidade de Évora.

³ Departamento de Fitotecnia, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal.

trabalho tem como objectivo avaliar a possibilidade de utilizar outras espécies de madeira, para além do carvalho, para fins enológicos. Para a concretização deste objectivo, o trabalho desenvolvido focou-se fundamentalmente na optimização de um método de extracção com líquido pressurizado (PLE) dos compostos fenólicos presentes em madeiras de castanho nacional e carvalho (nacional, francês e americano) e posterior quantificação destas substâncias, utilizando o método do padrão interno, recorrendo à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC-DAD).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Compostos padrão

Os compostos padrão utilizados neste trabalho foram:

5-hidroximetilfurfural (5-OHMefurf), 5-metilfurfural (5-Mefurf), seringaldeído (sering) adquiridos à Acros Organics; sinapaldeído (sinap) e coniferaldeído (conif) adquiridos à Aldrich; ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico e ácido ferúlico adquiridos à ExtraSynthèse; furfural (furf) e vanilina (vanil) adquiridos à Merck. O composto 4-hidroxibenzaldeído, adquirido à Lancaster, foi utilizado como padrão interno.

2.2- Aparas de madeira

As aparas de madeiras de castanheiro e carvalho nacional, francês e americano foram fornecidas pela J.M. Gonçalves- Tanoaria, Lda. As aparas de madeira utilizadas neste estudo apresentam uma dimensão 3 e um nível de tosta médio.

2.3- Equipamento

A extracção dos compostos fenólicos das aparas de madeira foi efectuada num extractor com líquido pressurizado (Dionex, ASE 100) equipado com uma célula de extracção de 10 mL.

As análises cromatográficas foram realizadas num sistema cromatográfico da marca Dionex, equipado com um detector DAD. O controlo, aquisição e tratamento dos dados cromatográficos foi efectuada recorrendo ao software “Chromeleon” (Dionex).

2.4- Método cromatográfico

O método cromatográfico utilizado baseou-se no método desenvolvido por Canas *et al.* (2003), o qual permite simultaneamente a identificação e determinação dos ácidos

fenólicos, dos aldeídos fenólicos e dos derivados furânicos. Contudo, neste trabalho foram introduzidas algumas alterações ao método descrito por Canas *et al.* (2003) de forma a otimizar a separação dos compostos 5-Mefurf, ácido sirínico e vanilina. As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram as seguintes: fase estacionária- coluna cromatográfica Merck Lichrospher RP18, 250 mm × 4 mm (5µm); temperatura da coluna 40°C, fluxo 1 mLmin⁻¹, volume injectado 25µL, gradiente binário constituído pelos solventes: solução aquosa de ácido fórmico (2%) (Eluente A) e solução de metanol: água: ácido fórmico (70:28:2 (v/v/v)) (Eluente B); método cromatográfico: gradiente linear de 0% a 40% B em 45 min seguido de gradiente linear de 40% a 60% B em 20 min. Os compostos fenólicos em estudo foram quantificados ao comprimento de onda de 280 nm.

2.5- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.5.1- Traçado das rectas de calibração dos padrões

Para o traçado das rectas de calibração prepararam-se soluções dos compostos padrão em metanol/água (1:1(v/v)), a partir de soluções mãe, com diferentes concentrações. Na tabela 1 encontram-se indicadas as concentrações das soluções mãe dos compostos padrão, assim como, as gamas de concentrações das soluções utilizadas para o traçado das rectas de calibração, para posterior quantificação dos compostos em estudo.

Tabela 1- Dados relativos às soluções padrão utilizados para o traçado das curvas de calibração

Composto padrão	Concentração da solução mãe (mgL ⁻¹)	Intervalo de concentrações (mgL ⁻¹)
Ácido gálico	1706	8,53- 1279,5
5-OHMefurf	1190	1,19- 119,0
Furf	1128	1,13- 112,8
Ácido vanílico	1702	8,51- 170,2
5-Mefurf	1186	5,93- 118,6
Ácido sirínico	1994	9,95- 199,0
Vanilina	154	7,70- 154,0
Seringaldeído	1838	9.19- 294,08
Ácido ferúlico	1954	9,77- 195,4
Coniferaldeído	1796	8,98- 359,2
Sinapaldeído	2114	10,57- 845,6

Para a quantificação dos compostos fenólicos em estudo foi utilizado o método do padrão interno (PI). Assim, a cada uma das soluções padrão foi adicionada um volume de solução

mãe de 4-hidroxibenzaldeído ($4,08 \text{ gL}^{-1}$) de modo que este composto esteja presente em todas amostras com uma concentração de $20,4 \text{ mgL}^{-1}$. As alíquotas das soluções padrão foram analisadas, em duplicado, por HPLC. Procedeu-se ao traçado das curvas de calibração A/A_{pi} (onde A corresponde à área do pico do composto em análise e A_{pi} é a área do pico correspondente ao PI) em função da concentração do analito.

2.5.2- Extracção dos compostos fenólicos das aparas de madeira por Extracção com líquido pressurizado (PLE)

As amostras de aparas de madeira foram previamente submetidas a uma moagem. A extracção dos compostos fenólicos presentes nas aparas de madeira foi efectuada num extractor com líquido pressurizado, equipado com uma célula de extracção de 10 mL. O processo de extracção envolveu a homogeneização de 500 mg de amostra de madeira com terra de diatomáceas e acondicionamento da mistura na célula de extracção, como esquematizado na figura 1.



Figura 1- Representação esquemática da extracção dos compostos fenólicos de aparas de madeira utilizando um extractor com líquido pressurizado.

Durante a optimização do processo de extracção dos compostos foram utilizados como solventes o diclorometano e o metanol, temperaturas de aquecimento de 100°C e 150°C e diferentes ciclos de extracção. O extracto foi evaporado no evaporador rotativo e, em seguida, o resíduo obtido foi dissolvido em $1990 \mu\text{L}$ de solução de metanol/água (1:1(v/v)) e adicionada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ de solução de padrão interno de concentração $4,08 \text{ gL}^{-1}$, de modo a que a sua concentração final de padrão interno seja de $20,4 \text{ mgL}^{-1}$. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de seringa de $0,45 \mu\text{m}$ (SartoriusStedim) e analisadas em HPLC por injeção directa de $25 \mu\text{L}$ da solução.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Traçado da recta de calibração dos compostos padrão

Este trabalho envolveu a prévia preparação de soluções de compostos padrão de diferentes concentrações. A análise cromatográfica de alíquotas destas soluções, por HPLC, permitiu o traçado de curvas de calibração de A/A_{pi} em função da concentração de soluções dos compostos padrão. Na tabela 2 encontram-se representados os parâmetros relativos às curvas de calibração para cada um dos compostos em estudo.

Tabela 2- Parâmetros das curvas de calibração para os compostos padrão

Composto padrão	Curva de calibração		
	m ^{a)}	b ^{b)}	r ^{2 c)}
Ácido gálico (1)	0,0191	-0,1346	0,9999
5-OHMefurf (2)	0,0503	0,01	0,9998
Furf (3)	0,0632	-0,0062	1
Ácido vanílico (4)	0,0118	0,0059	0,9998
5-Mefurf (5)	0,0454	0,0066	1
Ácido siríngico (6)	0,0209	-0,0021	0,9989
Vanilina (7)	0,0325	-0,1199	0,9995
Seringaldeído (8)	0,0122	-0,0031	1
Ácido ferúlico (9)	0,0177	-0,0435	0,9966
Coniferaldeído (10)	0,0103	-0,002	1
Sinapaldeído (11)	0,0051	-0,0471	0,9983

a) declive da curva de calibração; b) ordenada na origem; c) coeficiente de correlação.

3.2- Extracção dos compostos fenólicos das aparas de madeira por Extracção com líquido pressurizado (PLE)

Na tentativa de optimização de um método de extracção com líquido pressurizado (PLE) para a extracção dos compostos fenólicos presentes em aparas de madeira foram testadas diversas condições experimentais, tais como: o solvente de extracção (metanol/ diclorometano), a temperatura (100°C/ 150°C) e o número de ciclos de extracção (2/3). A análise dos cromatogramas de HPLC referentes aos extractos obtidos, utilizando diferentes condições experimentais, permitiu concluir que o método de extracção que utilizava como solvente o metanol, uma temperatura de 150°C e 3 ciclos de extracção era o mais adequado para esta finalidade uma vez que permitia extrair um maior número e uma maior quantidade de compostos fenólicos das amostras de madeira, como ilustrado na figura 2.

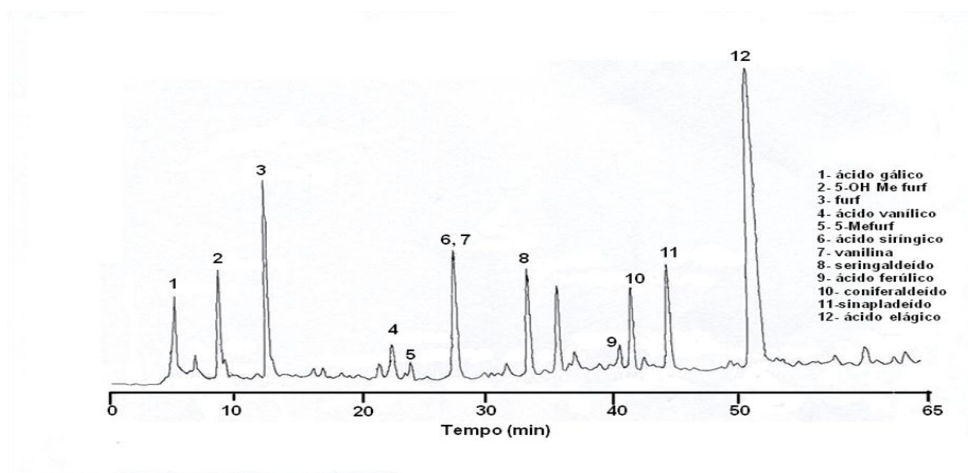


Figura 2- Cromatograma de HPLC correspondente à extracção dos compostos fenólicos de aparas de carvalho francês por PLE (Condições: T=150°C; Solvente: metanol; 3 ciclos de extracção). As condições cromatográficas encontram-se descritas na secção 2.4.. Os compostos assinalados foram identificados por comparação do tempo de retenção com os dos compostos padrão.

3.3- Quantificação dos compostos fenólicos presentes nas diferentes espécies de madeiras por HPLC

Após a optimização do processo de extracção dos compostos fenólicos por PLE, procedeu-se à identificação e quantificação de alguns compostos fenólicos presentes nas diferentes espécies de madeiras em estudo. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados nas figuras 4 e 5.

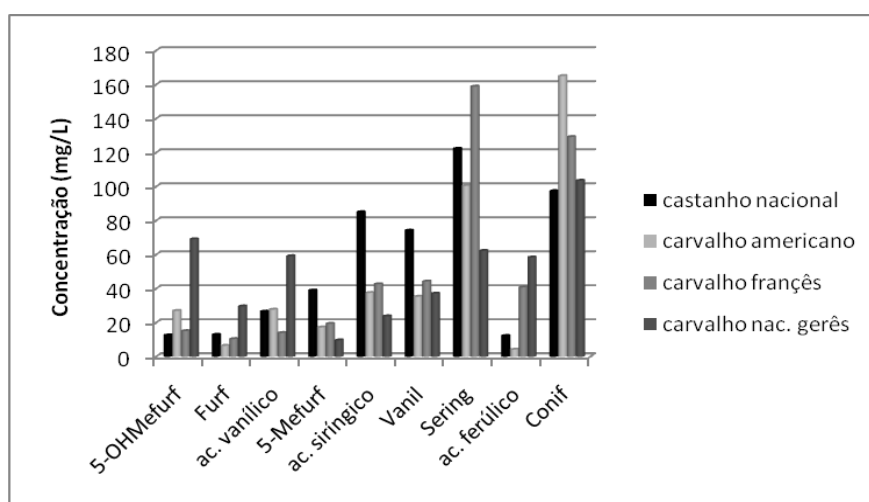


Figura 4- Histograma referente à composição fenólica de aparas de madeira de castanho nacional e carvalho (americano, francês e nacional).

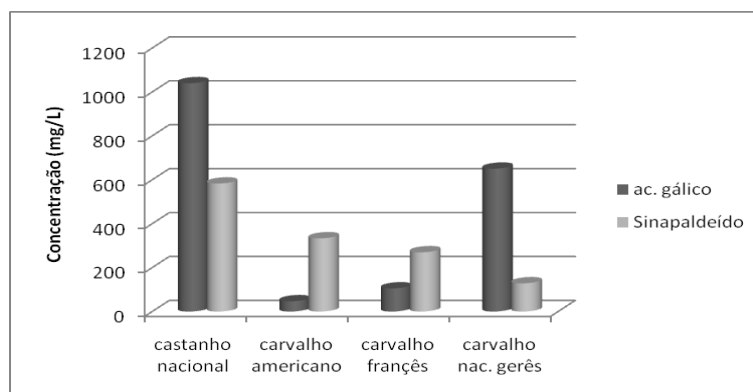


Figura 5- Histograma relativo à concentração em ácido gálico e sinapaldeído nas aparas de madeira de castanho nacional e carvalho (americano, francês e nacional).

É de salientar que este estudo incidiu sobre aparas de madeira que apresentam a mesma dimensão e foram submetidas ao mesmo tipo de tratamento térmico e, deste modo, as diferenças observadas ao nível da composição fenólica são exclusivamente provenientes da espécie botânica e da origem geográfica dessas madeiras. Assim, constatou-se que a intensidade dos compostos extraídos das aparas de madeira varia consoante a espécie em estudo, sendo que a espécie botânica parece ser mais importante do que a origem geográfica para a composição fenólica destas madeiras, tal como referido por CANAS *et al.* (2000). Por observação das figuras 4 e 5 é notório que o ácido gálico e o sinapaldeído encontram-se presentes em concentrações elevadas em todas as espécies de madeira estudadas, apresentando os teores mais elevados no castanho nacional, estando esta constatação de acordo com os resultados descritos por CANAS *et al.* (2000). Relativamente aos derivados furânicos (5-OHMefur e furf) os seus teores são mais elevados nas aparas de madeira de carvalho nacional do Gerês do que nas restantes espécies de madeira estudadas. Em relação aos ácidos fenólicos, o ácido sirínico encontra-se presente em concentração mais elevada no castanho nacional do que nas aparas de madeira de carvalho enquanto que o ácido ferúlico é mais abundante no carvalho nacional e francês.

4. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível otimizar um método de extracção de compostos fenólicos de aparas de madeira baseado em PLE e elaborar um estudo sistemático que permitiu correlacionar a composição fenólica de madeiras de castanheiro e carvalho (nacional, francês e americano). Encontra-se em curso a avaliação da composição fenólica de aparas destas espécies de madeira com aparas de dimensões diferentes e variados níveis de tosta,

com o objectivo de avaliar a influência destes parâmetros nos teores dos compostos fenólicos extraídos, perspectivando-se, posteriormente, o alargamento destes estudos ao vinho.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à J.M. Gonçalves- Tanoaria, Lda. o fornecimento das aparas de madeira utilizadas neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CABRITA M.J., TORRES M., PALMA V., ALVES E., PATÃO R., COSTA FREITAS A.M., 2008, Impacto of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta* **74**, 1281- 1286.

CANAS S., Leandro M.C., Spranger M.I., Belchior A.P., 2000 Influence of botanical species and geographical origin in on the content of low molecular weight phenolic compounds of woods used in Portuguese cooperage, *Holzforschung*, **54**, 1-7.

CANAS S., BELCHIOR A.P., SPRANGER M. I., BRUNO-de-SOUSA R., 2003, High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.* **26**, 496- 502.

CÉRDAN T.G., ANCÍN-AZPILICUETA C., 2006, Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization, *LWT* **39**, 199- 205.

PÈREZ-MAGARIÑO S., ORTEGA-HERAS M., CANO-MOZO E., GONZÁLEZ-SANJOSÉ M. L., 2009, The influence of oak wood chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**, 3, 204- 211.